5. 2 ノンラジオアクティブなゲルシフトアッセイの代表的な実験結果

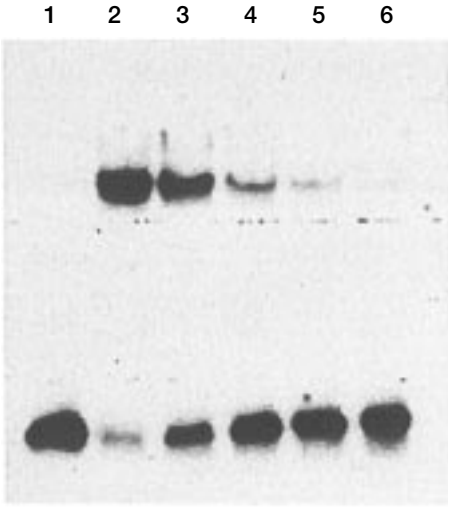

図 34. Oct2Aコントロールタンパクとオリゴヌクレオチドを用いたDIGゲルシフトアッセイ. コントロールOct2Aタンパクとさまざまな量のOct2A-結合オリゴヌクレオチド(DIG Gel Shift Kitに含まれる)を用いて，ゲルシフトアッセイを行った．反応により得られた複合体を12.5%のネガティブポリアクリルアミドゲルで分離し，エレクトロブロットによりナイロンメンブレンへトランスファーした. DIGラベルされた複合体を化学発光アッセイにより検出した(CSPD基質を用い，X-線フィルムに30分間露光)。
レーン1： DIGラベルされたOct2A結合サイトを持つコントロールオリゴヌクレオチド(0.8 ng)，レーン 2：DIGラベルされたコントロールオリゴヌクレオチド(30 fmol)を 50 ng の Oct2A コントロールタンパクとインキュベーションしたもの，レーン 3〜6： レーン2と同様， ただしラベルされていないコントロールのヌクレオチド量を増やしながらインキュベーションを行った(25, 62, 125, および250倍の過剰量，左から右へ)． 上側のバンドはタンパクとオリゴヌクレオチドとの複合体，下側のバンドは結合しなかったオリゴヌクレオチドである.

結果：Oct2Aコントロールタンパクは， DIGラベルされたコントロールオリゴヌクレオチドのサイトに特異的に結合しました(レーン 2). ラベルされていないオリゴヌクレオチド量を上げることにより(レーン 3 〜 6)，ラベルされたオリゴヌクレオチドとタンパクとの結合に競合が生じていることから，この反応が特異的であることが分かります.

6. DIGラベルされたDNAを直接検出する

PCR産物のDIGラベリングと，ナイロンメンブレンにトランスファーされたDIGラベルされたDNAの直接免疫検出は，臭化エチジウム染色に対して1000倍の感度をもたらします(以下のセクション 6.2「PCR DIG Labeling Mixを用いた代表的な実験結果」を参照ください).

このアッセイの主要製品

製品名	カタログ番号	製品の内容
PCR DIG Labeling Mix, 10 × 濃度	1 585 550	以下の濃度のヌクレオチドを水に溶解させた混合液 (10 × 濃度)， pH 7. ● dATP, 2 mM ● dCTP, 2 mM ● dGTP, 2 mM ● dTTP, 1.9 mM ● DIG-11-dUTP,アルカリ安定, 0.1 mM

追加で必要となる製品

製品名[1]	カタログ番号
Anti-DIG-AP, Fab fragments	1 093 274
Nylon Membranes, Positively Charged	1 209 299
Ready-to-use CDP-*Star*	2 041 677
DIG Wash and Block Buffer Set	1 585 762

1 これらの製品に関する詳細な情報については，第 2 章または付録 Eのご注文情報を参照ください.

6.1 アッセイの概要

PCR DIGラベリング混合液を用いて調製されたDNAの直接免疫検出には，以下の実験ステージにより行われます.

ステージ	操作の説明	所要時間
A	PCR DIG Labeling Mixを含む反応混合液を用いたPCRにより，ターゲットDNAを増幅させます[1].	約2時間
B	試料をアガロースゲル分離します(TBEまたはTAEバッファー中で).	30分間 ～2時間
C	分離されたDNA増幅産物を, キャピラリートランスファーによりポジティブチャージのナイロンメンブレンにトランスファーします[2]. ***ノート：***トランスファー前にDNAを変性させる必要はありません.	オーバーナイト
D	DIGラベルされたターゲットDNAを, アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体およびCDP-*Star* アルカリホスファターゼ化学発光基質を用いて検出します[2]. ***ノート：***検出操作には, DIG Wash and Block Buffer Setも使用されます.	約 2.5時間
E	X-線フィルムまたはイメージャーを用いて化学発光のシグナルを記録します.	5～20分間

1 直接ラベリング操作の詳細については，PCR DIG Labeling Mix, Cat. No. 1 585 550 の取扱説明書を参照ください. この取扱説明書は，弊社のウェブサイト(http：//www.roche-applied-sciene.com)でもご覧いただけます.
2 これらの製品に関する詳細な情報については，第 2 章のセクション 3.1, 4.1を参照ください.